241-09514

SHIMADZU

1step G1

Ampdirect® Technology

1step RT-PCR ノロウイルスG1検出試薬キット

1step RT-PCR Norovirus G1 Detection Kit

P/N:241-09500-92

取扱説明書

この文書をよく読んで正しくご使用ください。
いつでも使用できるように大切に保管してください。

特長

■1step RT-PCR でノロウイルス G1 を検出することができます。
■1 本のチューブで検体処理から RT-PCR までのトータルな操作ができます。糞便検体に処理試薬を加えて加熱するだけで直接、Reverse Transcription（RT）-PCR ができます。
■偽陰性対策として内部コントロール DNA（I.C.）を含んでいます。

試薬構成

No.	試薬名称	キャップ	本数	液量
①	Sample Treatment Reagent	橙	1 本	912 µL
②	NV Reagent A	赤	1 本	1.2 mL
③	RT Enzyme	紫	1 本	12 µL
④	NV Reagent B	緑、ループ付	1 本	216 µL
⑤	PCR Enzyme	紫、ループ付	1 本	12 µL

使用回数:48 tests 保存温度:-20 ℃ 使用期限:包装袋のラベルに記載

キット以外に必要な機器・消耗品・試薬

検出方法によって異なります。I. 電気泳動検出 / II. 融解曲線解析

■機器・消耗品	I	II
1) PCR 装置	◎	
2) リアルタイム PCR 装置		◎
3) 電気泳動装置	◎	
4) 恒温装置（PCR 装置での代用も可）	○	○
5) 高速遠心機（10,000 rpm で遠心可能なもの）	◎	◎
6) マイクロピペットおよびフィルター付チップ	◎	◎
7) 小型遠心機（スピンダウン用）	◎	◎
8) ボルテックスミキサー	◎	◎
9) 氷（クラッシュアイス）および冷却用アルミブロック	◎	◎
10) PCR 反応チューブ	◎	
11) リアルタイム用 PCR 反応チューブ		◎
12) 糞便懸濁液調製用チューブ（1.5 mL ~ 2 mL）	◎	◎
13) 反応液調製用チューブ（0.5 mL ~ 2 mL）	◎	◎

■試薬	I	II
14) アガロースゲル※1および分子量マーカー	◎	
15) 125 × SYBR® Green I 溶液※2		◎
16) 1 × TE 緩衝液		◎
17) 糞便懸濁液調製用蒸留水（または生理食塩水）	◎	◎

◎：必要、○：必要な場合のみ

※1：低分子フラグメントの分離に適したアガロースゲルをご使用ください。
※2：125 × SYBR® Green I 溶液は用時調製してください。
ここでは Thermo Fisher Scientific 社製『SYBR® Green I nucleic acid gel stain』(10,000×)を TE にて 80 倍希釈（125×）した溶液を使用しています。
SYBR® Green I は、Thermo Fisher Scientific 社が特許を保有しています。正当権利者より購入してください。

注意事項

1. 試薬に関する注意事項

・**本製品は研究用です。**医療行為や診断目的には使用できません。また、医療品・化粧品・食品として、人や動物の身体に使用できません。
・本取扱説明書および SDS に従って正しくお使いください。SDS の入手は当社までお問合わせください。
・G2 の検出が必要な場合は、姉妹品に『1step RT-PCR ノロウイルス G1&G2 検出試薬キット（P/N:241-09500-91）』および『1step RT-PCR ノロウイルス G2 検出試薬キット（P/N:241-09500-93）』があります。それぞれ取扱説明書に従って、正しくお使いください。

2. 廃棄に関する注意事項

・PCR 後の反応チューブのふたはしっかりと閉じて廃棄してください。特に、電気泳動検出を行った場合は注意してください。
・廃棄の際にオートクレーブは行わないでください。DNA はオートクレーブでは分解されません。エアロゾルが発生して汚染原因となる可能性があります。
・廃棄物は、法令や自治体等の条例・規制等に従って適切に廃棄してください。

3. その他

・本取扱説明書に記載の会社名・商品名は各社の商標の場合があります。本文中では一部®・TM を省略しています。
・Ampdirect®は㈱島津製作所の登録商標です。
・SYBR®は、Thermo Fisher Scientific 社の登録商標です。
・本取扱説明書の著作権は㈱島津製作所が保有します。当社の許可無く内容の一部または全部を転載・複製することはできません。
・この製品は㈱ビー・エム・エルが保有する特許第 4437525 号のライセンス許諾に基づいて製造・販売しています。本製品の購入者は、本製品を商業目的を含む用途で使用できます。

操作方法

使用上の注意

・試薬①、②、④を室温にて解凍後、転倒混和またはボルテックスミキサーなどで、**しっかり混和**してスピンダウンし、**使用時まで冷却下で保存**してください。
・試薬③、⑤は**使用時まで冷凍（-20 ℃）保存**してください。
・試薬の劣化を防ぐために、凍結融解を過度に繰り返すことは避けてください。
・操作中にチューブ内で液が飛び散った場合は、スピンダウンしてから使用してください。
・機器は、それぞれの製品に付属する取扱説明書などに従って、正しく使用してください。

1 検体処理

(1) 検便検体を蒸留水または生理食塩水に 5 ~ 10 %（W/V）の濃度で懸濁します（0.1 ~ 1 mL 程度/1 検体）。
(2) 糞便懸濁液を 10,000 rpm、5 分間の遠心分離を行います。
(3) PCR 反応チューブに①Sample Treatment Reagent 19 µL と糞便遠心上清 1 µL を添加し、ピペッティングまたはタッピングでしっかり混合します（総液量 20 µL/ チューブ）。
(4) 恒温装置で 90 ℃、5 分間の加熱処理を行います。
(5) 氷冷します。

2 反応試薬調製・解析（裏面へつづく）

検出方法によって異なります。

I. 電気泳動検出 ： 電気泳動により特異的増幅産物のバンド長を検出します。
II. 融解曲線解析 ： SYBR® Green I を使用して融解温度を検出します。PCR 後の反応チューブのふたを開けずに検出するため、汚染リスクを低減できます。

2 反応試薬調製・解析（つづき）

Ⅰ 電気泳動検出

(1) 反応液調製用チューブで RT-PCR 反応液を調製します。
（必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします）
・RT-PCR 反応液はピペッティングでしっかりと混和してください。
・調製後の反応液は 2 時間以内にご使用ください。

RT-PCR 反応液（1 テスト分）

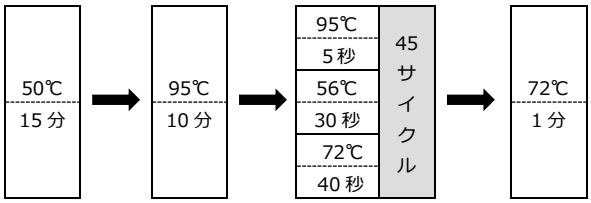
② NV Reagent A	:	25 µL
③ RT Enzyme	:	0.25 µL
④ NV Reagent B	:	4.5 µL
⑤ PCR Enzyme	:	0.25 µL
Total	:	30 µL

反応液の調製と分注は必ず氷冷下で行い、反応開始直前まで冷やしてください。

(2) **1** で前処理した検体：20 µL の入った PCR 反応チューブに、(1) の RT-PCR 反応液:30 µL を添加します(総液量 50 µL/ チューブ)。

(3) PCR 装置にて 1step RT-PCR 増幅を行います。
設定条件は以下のとおりです。

1step RT-PCR 増幅条件

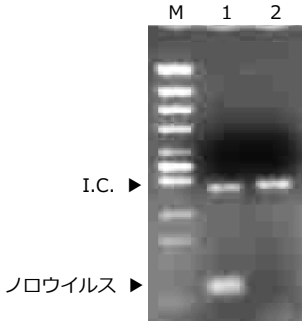


(4) 電気泳動にて RT-PCR 増幅産物を確認し、判定します。
反応チューブのふたを開ける際は、必ずスピンダウン後、反応液の飛散に十分注意してください。

ノロウイルス ＼ I.C.		産物長：251 bp	
		○	×
産物長：85 bp	○	陽性	陽性
	×	陰性	判定不能※1

※1：いずれの増幅産物も確認できないときは、再解析を行います。
RT-PCR 阻害が疑われる場合は、糞便上清を蒸留水または生理食塩水で 10 倍希釈して同様の反応・検出を行ってください。

【検出例】



M：分子量マーカー
（ΦX174DNA の *Hinc* Ⅱ消化物）
1：糞便-1
2：糞便-2

アガロースゲル濃度： 4 %
ゲルへの産物添加量： 10 µL/ ウェル
泳動条件 ： 100 V、25 分
泳動バッファー ： TAE

判定結果

糞便-1：ノロウイルス陽性　　糞便-2：ノロウイルス陰性

Ⅱ 融解曲線解析

(1) 反応液調製用チューブで RT-PCR 反応液を調製します。
（必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします）
・RT-PCR 反応液はピペッティングでしっかりと混和してください。
・調製後の反応液は 2 時間以内にご使用ください。

RT-PCR 反応液（1 テスト分）

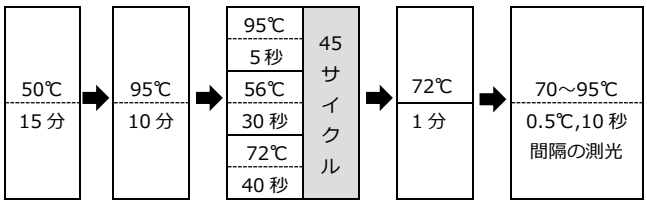
② NV Reagent A	:	25 µL
③ RT Enzyme	:	0.25 µL
④ NV Reagent B	:	4.5 µL
⑤ PCR Enzyme	:	0.25 µL
125×SYBR® Green Ⅰ	:	1 µL
Total	:	31 µL

反応液の調製と分注は必ず氷冷下で行い、反応開始直前まで冷やしてください。

(2) **1** で前処理した検体：20 µL の入った PCR 反応チューブに、(1) の RT-PCR 反応液:31 µL を添加します(総液量 51 µL/ チューブ)。

(3) リアルタイム PCR 装置にて 1step RT-PCR 増幅と融解曲線解析を行います。設定条件は以下のとおりです。

1step RT-PCR 増幅条件／融解曲線解析条件



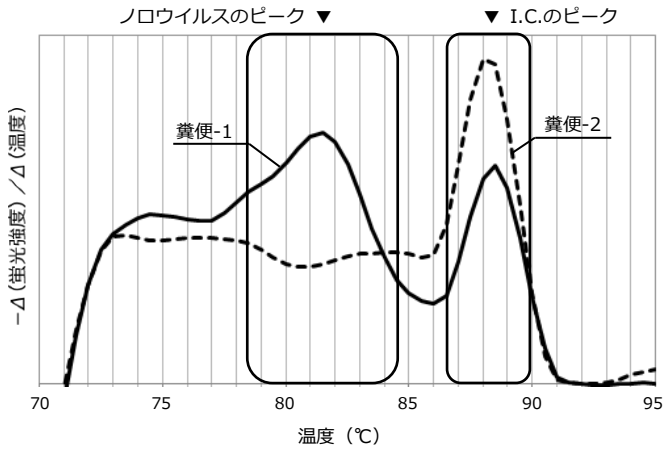
(4) 融解曲線のピーク検出温度にて RT-PCR 増幅産物を確認し、判定します。

島津製作所遺伝子検出装置 GVP-9600 によるピーク検出例※2

ノロウイルス ＼ I.C.		ピーク検出温度 86.5 ℃～90.0 ℃	
		○	×
ピーク検出温度 78.5 ℃～84.5 ℃	○	陽性	陽性
	×	陰性	判定不能※3

※2：お使いの装置によってピーク検出温度範囲が上記と異なる場合があります。他社装置を使用している場合は、お客様にてその装置に合わせた陽性または陰性の判断基準の検討が必要です。
※3：いずれのピークも確認できないときは、再解析を行います。
RT-PCR 反応阻害が疑われる場合は、糞便上清を蒸留水または生理食塩水で 10 倍希釈して同様の反応・検出を行ってください。

【検出例】



判定結果

糞便-1：ノロウイルス陽性　　糞便-2：ノロウイルス陰性

参考：融解曲線解析を行った後の PCR 増幅産物を電気泳動により検出することも可能ですが、反応液中に含まれる SYBR® Green Ⅰ の影響で泳動が遅くなり増幅産物のサイズが実際より長く検出されます。

技術的な内容に関するお問合せ窓口
株式会社島津製作所
分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット　TEL：075-823-1351
http://www.an.shimadzu.co.jp/general/contact/contact.htm

© 2015 Shimadzu Corporation. All rights reserved.